



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

JOSÉ MÁRIO DE ALMEIDA FONSECA

**ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE CONTROLE
FÍSICO-QUÍMICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL DA FACULDADE DE
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**Relatório de estágio apresentado
para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de
Brasília**

Brasília, DF
2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

JOSÉ MÁRIO DE ALMEIDA FONSECA

ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE CONTROLE
FÍSICO-QUÍMICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL DA FACULDADE DE
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Relatório de estágio apresentado
para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília

Orientador
Profª Drª Carolina Riscado Pombo

Brasília, DF
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, José Mário de Almeida

Acompanhamento das atividades do Laboratório de controle físico-químico de produtos de origem animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense / José Mário de Almeida Fonseca, orientação de Carolina Riscado Pombo – Brasília, 2012.

34 p.:il

Relatório de estágio – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Laboratório de controle físico-químico. 2. Alimentos. 3. Biossegurança

Cessão de Direitos

Nome do Autor: José Mário de Almeida Fonseca

Título do Relatório de estágio para Conclusão de Curso: Acompanhamento das atividades do Laboratório de controle físico-químico de produtos de origem animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Ano: 2012

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte deste relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

JOSÉ MÁRIO DE ALMEIDA FONSECA

E-mail: ze.almeida@live.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: FONSECA, José Mário de Almeida

Título: Acompanhamento das atividades do Laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense

Relatório de estágio apresentado para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

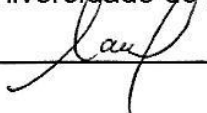
Aprovado em:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Carolina Riscado Pombo

Julgamento: Aprovado

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Profa. Dra. Ângela Patrícia Santana

Julgamento: Aprovado

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Julgamento: Aprovado

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Vanderlei Lopes da Fonseca e Maria de Lourdes Torres de Almeida Fonseca por toda a orientação, suporte e incentivo fundamentais à minha formação ética e moral. Agradeço também à minha avó Maria Nair Torres de Almeida por todo o carinho e alegria vivenciados em sua presença.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 ESTRUTURA E ROTINA DO LABORATÓRIO DE CONTROLE FÍSICO QUÍMICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL PERTENCENTE À FACULDADE DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	2
2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	5
2.1.1 Análise de umidade	6
2.1.2 Análise de lipídios	7
2.1.3 Análise de cinzas	8
2.1.4 Análise de proteínas	8
2.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	10
2.3 ANÁLISE DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS (BVT) PELO MÉTODO DE MICRODIFUSÃO EM PLACA DE CONWAY	12
2.4 PROVA DE NESSLER PARA AMÔNIA (NH ₃)	15
2.5 PROVA DE ÉBER PARA GÁS SULFÍDRICO (H ₂ S)	16
2.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)	18
2.7 DOSAGEM DE HISTAMINA PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA POR CAMADA DELGADA (CCD)	19
2.8 EXTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	24
3 CASUÍSTICA E RESULTADOS	30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A análise bromatológica, no contexto da química analítica aplicada, desempenha um papel importante na avaliação da qualidade e segurança dos alimentos. A sua utilização pode se tornar decisiva para equacionar e resolver problemas de saúde pública, além de complementar as ações de vigilância sanitária. Devido à complexidade da sua constituição orgânica, os alimentos são considerados matrizes difíceis de serem manipuladas; o analista deverá estar devidamente treinado e apenas a experiência apreendida ao longo do tempo poderá fornecer segurança nos resultados. Dentre os requisitos essenciais para evidenciar a qualidade de um trabalho laboratorial, a escolha da metodologia analítica é de grande relevância, pois de nada adianta um laboratório dispor de instalação e equipamentos modernos, se o método utilizado para as análises não for apropriado (BRASIL, 2008a).

Com a Revolução Industrial, os alimentos passaram a ser processados para que fossem menos perecíveis e atendessem a crescente demanda, que deu origem à necessidade de um controle desses alimentos, tanto para manutenção de seus atributos como para evitar fatores negativos que pudessem ocorrer no processamento, surgindo, desta forma, o controle de qualidade. Dentre os objetivos do controle de qualidade, destaca-se a necessidade de identificar substâncias prejudiciais originadas da deterioração dos alimentos, quantificar o uso de substâncias aditivas, identificar fraudes no processamento e contaminantes incidentais além de determinar a composição centesimal e os princípios ativos dos componentes (MÁRSICO e MANO, 2008).

Um laboratório de controle de alimentos, segundo Brasil (2008a), deve estar engajado em programas de garantia da qualidade, envolvendo o controle de qualidade analítica e também a biossegurança. Levando-se em conta que os critérios para a seleção e escolha de determinada metodologia analítica se encaixam no contexto da qualidade do laboratório.

Baseado nessas informações, este trabalho teve como objetivo principal relatar as atividades desenvolvidas no Laboratório de controle físico-químico de produtos de origem animal pertencente à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, no período de abril a agosto de 2012, em um total de 480 horas de estágio supervisionado.

2 ESTRUTURA E ROTINA DO LABORATÓRIO DE CONTROLE FÍSICO QUÍMICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL PERTENCENTE À FACULDADE DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Os responsáveis pelo laboratório são os professores doutores Eliane Teixeira Mársico, Carlos Adam Conte Júnior e Sérgio Borges Mano, que são também responsáveis pelo grupo da pós-graduação, bolsistas, técnicos e estagiários que frequentam o local. As linhas de pesquisa envolvem controle físico químico de alimentos de origem animal, métodos analíticos aplicados a alimentos, tecnologias modernas de conservação de alimentos, métodos avançados em química, bioquímica e biologia molecular, análises eletroforéticas e cromatográficas, além do controle de qualidade de produtos de origem animal.

As análises realizadas no laboratório de controle físico químico podem ser divididas em dois grupos: as análises de rotina e as análises experimentais. As de rotina são requerimentos de diversas indústrias, que encaminham amostras ao laboratório para que seja feita a avaliação geral da qualidade de determinados produtos ou para a realização de análises específicas necessárias para o controle de qualidade. As técnicas analíticas experimentais são feitas pelos alunos da pós-graduação que, às vezes, são auxiliados por técnicos ou estagiários. Os protocolos utilizados para as análises seguem os modelos de acordo com o Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) (BRASIL, 1981, 2008a). Diversos protocolos utilizados nas linhas de pesquisa são adaptações de pesquisadores incluindo os professores responsáveis pelo laboratório e não, necessariamente, constam nos arquivos do laboratório como os utilizados para as análises de rotina. As mudanças na legislação são adaptadas à rotina assim que identificadas.

O laboratório pode ser classificado como nível dois de segurança, de acordo com o Manual de Segurança Biológica em Laboratório (OMS, 2004) e possui uma estrutura dividida em cinco salas.

A **figura 1** representa a estrutura do laboratório com suas divisões. A sala principal é o local onde a maioria das atividades são realizadas.

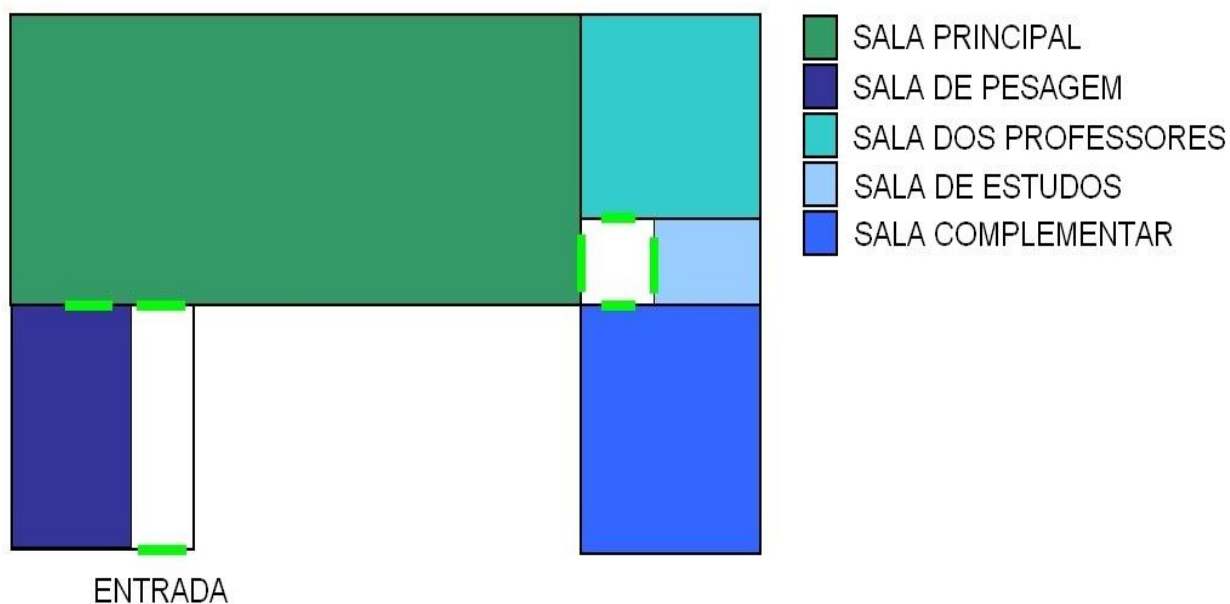


Figura 1 – Planta do laboratório de controle físico químico de P.O.A

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

A sala principal possui duas bancadas centrais, dispostas horizontalmente, e bancadas que acompanham o perímetro do local. Anexados às bancadas existem armários para o armazenamento de vidrarias e outros materiais. Nas bancadas centrais podem ser encontrados pHmetros, agitadores, aquecedores, banhos-maria, suportes para bureta e pias nas extremidades para a lavagem de vidrarias e utensílios. Na sala principal encontram-se a capela, mural de atividades, freezer, geladeira, estantes com reagentes, exaustor, extintores, kit de primeiros socorros, pias, comando de eletricidade e bancadas com equipamentos mais pesados, como estufas, forno mufla, dessecadores, centrífugas e destiladores.

A sala de pesagem possui uma bancada livre para manuseio de amostras e uma para aparelhos como espectrofotômetro, medidor infravermelho de umidade, balanças de precisão e balança analítica. O restante da aparelhagem do laboratório está na sala complementar e são eles: computadores, cromatógrafo líquido e gasoso, geladeiras, freezers,

destiladores, suporte para soxhlet, aquecedor e armários com materiais diversos.

Além da estrutura observada na figura 1, há uma sala com acesso independente destinada ao estoque de reagentes que são utilizados no laboratório físico químico e dispõe de estantes para os reagentes com área para substâncias usadas nas análises (ácidos, bases, solventes, sais e indicadores), área para inflamáveis e exaustor.

A rotina no laboratório é variada e depende das indústrias que encaminham amostras e do tipo de análise que necessitam. Durante o período de realização do estágio, diversas empresas encaminharam amostras para o laboratório e solicitaram análises de histamina, amônia, sensorial, pH, gás sulfídrico, umidade, cinzas e outras. Além das análises experimentais e de rotina, há uma reunião da pós-graduação que ocorre semanalmente, às quartas-feiras pela manhã, em que os alunos seguem um cronograma de apresentações montado no início do semestre e debatem os projetos, teses e dissertações que estão em desenvolvimento. Quando terminada a apresentação da semana, é aberto um espaço para dúvidas, questionamentos e sugestões e por fim ocorre um debate sobre o dia a dia do laboratório que serve para manter todos a par das atividades. Eventualmente a estrutura do laboratório é também utilizada para as aulas práticas das disciplinas de Tecnologia e Inspeção de Alimentos da Universidade Federal Fluminense.

Com relação à segurança em laboratório, todos os novos estagiários e bolsistas recebem no primeiro dia de atividade, o modelo de segurança que é adotado no local e, em seguida, respondem a um questionário escrito, que será debatido com um dos técnicos ou pós-graduandos, enfatizando a importância do uso de vestimenta adequada como jaleco, calça comprida e sapato fechado, bem como a manipulação correta de equipamentos, vidrarias e reagentes utilizados nas análises. Também é tratada a importância da limpeza correta dos materiais e do local, do uso de equipamentos de proteção individual quando necessário, do descarte correto de resíduos e como proceder em caso de acidentes, que seriam mais frequentes, caso não fosse realizada tal atividade.

Outras práticas realizadas no ambiente laboratorial são os treinamentos de utilização dos novos aparelhos que são instalados. Durante o período de realização do estágio, foi feito o treinamento com um tutorial de funcionamento dos cromatógrafos líquidos que foram instalados na sala complementar. O

técnico responsável pela instalação dos aparelhos ficou disponível por três dias para ensinar o correto manuseio, tirar dúvidas e acompanhar as análises feitas nos novos equipamentos. Prática que foi registrada na **figura 2**.



Figura 2 – Treinamento para utilização do cromatógrafo líquido de alta eficiência

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

No término do século XVIII, foi realizada a primeira análise quantitativa em alimentos, feita em batatas, por George Pearson, na Inglaterra, em 1795. Ele estimou a proporção de água, amido, material fibroso, cinzas e outras eventuais substâncias, e, também, reconheceu a existência de lipídios, ácidos e açúcar (GIUNTINI, 2006).

Com o passar do tempo e o desenvolvimento dos métodos analíticos, a composição dos alimentos se tornou mais compreendida devido à possibilidade de identificação e quantificação dos compostos que integram determinado alimento. A linha de pesquisa da Universidade Federal Fluminense em conjunto com o Exército Brasileiro utiliza-se da carne de peito de frango cozido como

matriz de pesquisa. Dentre as análises realizadas com o peito de frango, estão as análises da composição centesimal, sendo elas, umidade, cinzas, proteínas e lipídios. Além dessa linha de pesquisa, a grande maioria dos experimentos no laboratório utiliza essas análises, pois são dados que acrescentam informações de grande importância para os trabalhos desenvolvidos.

2.1.1 ANÁLISE DE UMIDADE

Segundo Brasil (2008a), todos os alimentos contêm água e, geralmente, a umidade representa essa água contida no alimento, que pode ser classificada em: umidade de superfície, referente à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada, e umidade adsorvida, representada pela água contida no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo.

As carnes de aves apresentam um valor de umidade percentual em torno de 76%, que pode variar de acordo com a espécie e com o teor de gordura. A água influi na qualidade da carne nos aspectos referentes à suculência, maciez, cor e sabor, além de participar das reações que ocorrem na carne durante a refrigeração, estocagem e processamento (JULIÃO, 2003).

A análise de umidade realizada no período de realização do estágio foi a de secagem direta em estufa a 105 °C, que começa com a pesagem de uma cápsula de porcelana e, em seguida, a adição de cinco gramas de amostra para o aquecimento em estufa durante 3 horas. Ao sair da estufa, a amostra é resfriada em dessecador por 20 minutos sendo pesada em seguida. Após a pesagem, a cápsula com a amostra segue novamente para a estufa, ficando por mais uma hora. Posteriormente é resfriada no dessecador e outra pesagem é feita, sendo que esta última etapa será repetida até que o peso da cápsula fique constante, ou seja, pare de reduzir com a evaporação da água e outros componentes que sejam voláteis a 105 °C. O peso final será usado no seguinte cálculo para a obtenção do resultado:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde,

N = Número de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = Número de gramas da amostra

2.1.2 ANÁLISE DE LIPÍDIOS

A carne de aves é considerada de excelente qualidade nutricional devido ao alto teor proteico, baixo teor de lipídios, colesterol e ácidos graxos saturados. É considerada um alimento de digestão fácil, sendo bastante indicada na alimentação de crianças, pessoas idosas e convalescentes (JULIÃO, 2003).

Segundo Julião (2003), a quantidade de gordura presente na carne é uma característica de qualidade que vem ganhando cada vez mais importância devido à crescente preocupação com o fato de que dietas com alto teor de gordura levam ao aumento da ocorrência de problemas cardiovasculares. As carnes de peito de aves têm teor muito baixo de gordura devido à reduzida necessidade de estocar energia nestes músculos.

A análise para a determinação de lipídios é gravimétrica e a separação da gordura da amostra é realizada por meio do Soxhlet, sendo que o primeiro passo é pesar o balão volumétrico para a determinação do peso da gordura após o isolamento. Outro procedimento utilizado é o aproveitamento da amostra que foi usada na análise de umidade, pois a água interfere na extração dos lipídios.

A amostra deve ser inserida em cartuchos próprios para o Soxhlet, com o auxílio de algodão desengordurado e, em seguida, o balão volumétrico utilizado na primeira pesagem deve ser preenchido em dois terços do volume com éter de petróleo. Com o cartucho e balão acoplados no Soxhlet, dá-se início ao processo de separação em que o éter do balão é aquecido até evaporar, condensar e entrar em contato com a amostra no cartucho. O éter se liga à gordura da amostra por polaridade e então sifona no aparelho e retorna para o balão volumétrico. Dessa maneira, o processo se repete até que toda gordura esteja presente no balão. O tempo de espera adotado no laboratório é

de seis horas para que haja a garantia de que a separação foi realizada por completo. A última etapa é a evaporação do éter do balão na capela de exaustão ou banho-maria, para a então pesagem final. A porcentagem de gordura é dada pela divisão do peso obtido da gordura pelo peso inicial da amostra utilizada para a análise de umidade.

2.1.3 ANÁLISE DE CINZAS

As cinzas são o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO_2 , H_2O e NO_2 . Por definição, as cinzas são os resquícios do alimento após o aquecimento em temperaturas próximas a 550 a 570 °C, sendo constituídas, principalmente, de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg, pequenas quantidades de Al, Fe, Cu e Mn, além de variados elementos traços. As cinzas obtidas após o aquecimento não representam, necessariamente, a mesma composição que a matéria mineral presente originalmente no alimento, pois pode haver perda por volatilização ou interações entre os constituintes da amostra (MÁRSICO e MANO, 2008).

Assim como as análises de umidade e lipídios, a determinação da quantidade de cinzas para os alimentos é realizada por pesagens. As cinzas representam o resíduo mineral fixo presente nos alimentos, que é quantificado por meio da incineração da amostra em um cadinho de fusão e bico de bunsen até a formação de carvão. Em seguida, a amostra segue para o forno mufla a 550 °C, por uma hora e meia, até a eliminação completa do carvão. O cadinho deve ser resfriado em dessecador e pesado. A porcentagem de cinzas é dada pela divisão do peso das cinzas presentes no cadinho de fusão pelo peso inicial da amostra.

2.1.4 ANÁLISE DE PROTEÍNA

As proteínas são compostos nitrogenados, formados por cadeias de aminoácidos, cuja sequência difere uma proteína da outra. Existem aminoácidos considerados essenciais na dieta, devendo ser supridos quando não fazem parte de um determinado alimento, pois não são sintetizados no organismo e, dessa maneira, as proteínas são consideradas de alto valor

biológico quando contém aminoácidos essenciais em quantidade adequada e, também, um alto grau de digestibilidade (JULIÃO, 2003).

A análise de proteína é feita com a determinação de nitrogênio total pelo método Kjeldahl, de acordo com o protocolo do laboratório, que compreende duas etapas: digestão da amostra para converter o nitrogênio a íon amônio e determinação do íon amônio através da destilação e titulação (FERREIRA, 2007).

Na etapa da digestão, a amostra é aquecida com ácido sulfúrico e a reação é acelerada com uma mistura catalítica com sais que promovem o aumento da velocidade de oxidação da matéria orgânica. Com a adição do ácido sulfúrico junto ao nitrogênio presente na amostra, há a formação do sulfato de amônio, que será acrescido de hidróxido de sódio e levado ao destilador. Haverá, então, a liberação do amoníaco (NH_3) e água com a formação de sulfato de sódio. O produto da destilação segue para um Becker com ácido bórico e indicador misto de Tashiro com coloração azul devido ao ácido. A reação com o NH_3 forma o borato de amônio, que deixa o meio alcalino e altera a cor da solução para verde. A próxima etapa é a titulação (figura 3).



Figura 3 – Titulação da amostra para determinação de nitrogênio

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

A titulação (**figura 3**) é feita com ácido clorídrico a 0,1 N até a nova mudança de cor para o azul. Dessa maneira, a quantidade de ácido utilizada, será usada na seguinte fórmula para a determinação de nitrogênio total da amostra.

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(V \times N \times 1,4)}{P} \times 6,25$$

Onde,

V = Volume do ácido clorídrico utilizado

N = Normalidade do ácido (0,1)

P = Peso da amostra em gramas

2.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Uma das linhas de pesquisa acompanhadas no período de realização do estágio representa uma parceria da Universidade Federal Fluminense com o Exército Brasileiro, cujo objetivo é o processamento de fontes de proteína visando levar aos soldados a campo um alimento palatável como complemento à ração liofilizada atualmente em uso. A fonte de proteína utilizada nas análises é o peito de frango, que é grelhado, embalado a vácuo, irradiado e embalado novamente com um material laminado, que evita a incidência de luz.

O processamento e armazenamento visa retardar ao máximo a degradação da carne. A irradiação feita com Césio-137 a 45 kGy é realizada para eliminar os microrganismos. Mesmo com a irradiação, a carne de frango pode passar por processos de degradação, independentemente da presença de bactérias. Dentre eles está a rancidez oxidativa, que ocorre, principalmente, devido à presença de gordura insaturada nos alimentos. Para acompanhar a presença da rancidez oxidativa, também chamada de oxidação dos lipídios, é realizada periodicamente, a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que identifica um dos produtos da rancidez.

Segundo Araújo (2011), a oxidação é um fenômeno natural, que ocorre em alimentos e bebidas, responsável por uma série de alterações causadoras da perda do valor nutricional, da alteração das características sensoriais, da rejeição do produto e eventualmente, da formação de compostos tóxicos nos alimentos. No caso das reações de oxidação de lipídios, os principais

problemas decorrentes são as alterações sensoriais que envolvem o desenvolvimento de aromas desagradáveis, denominados de forma genérica como ranço.

A rancidez oxidativa é iniciada pelo ataque do oxigênio molecular às ligações duplas dos ácidos graxos insaturados que compõem um lipídio. Esse processo dará origem a radicais livres, que vão originar produtos potencialmente tóxicos conhecidos como aldeídos, cetonas, peróxidos, hidroperóxidos, além de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos), de baixo peso molecular, voláteis e que originam o típico sabor ou odor de ranço de uma substância oxidada (CONEGLIAN, 2011).

Segundo Terra (2006), a oxidação dos lipídios é um dos problemas que causam as deteriorações e alterações no aroma com a diminuição na vida útil das carnes e dos produtos cárneos. Mais importante do que o teor lipídico de um alimento, é a forma na qual este se encontra e, conseqüentemente, sua possível participação em doenças crônicas ou degenerativas. O aldeído malônico e outros produtos da oxidação lipídica têm chamado a atenção da comunidade científica por sua provável relação com a formação de câncer. Valores de TBARS acima de 1,59 mg de aldeído malônico por kg de amostra podem causar danos à saúde do consumidor.

A técnica é iniciada com a pesagem de 10 gramas de amostra que será misturada em liquidificador com 50 mL de água destilada durante dois minutos. Com o auxílio de adicionais 47,5 mL de água destilada, a amostra deve ser transferida para um tubo de destilação do tipo Kjeldahl ao qual serão adicionados 2,5 mL de ácido clorídrico 4 N para que haja correção do pH. Em seguida, o tubo será conectado ao destilador e a amostra passará por um processo físico até a obtenção de 50 mL de destilado. Cinco mL da amostra destilada devem ser transferidas para um tubo de ensaio rosqueado ao qual serão adicionados cinco mL de ácido tiobarbitúrico (TBA).

A etapa seguinte é o aquecimento do tubo de ensaio com a amostra em um aquecedor, ou banho-maria, durante 35 minutos e, então, o resfriamento em água corrente por 10 minutos. Por último, será feita a leitura da absorbância da amostra com o auxílio de um espectrofotômetro a 538 nm, previamente calibrado com um padrão para coloração branca, feito com 5 mL de água destilada e 5 mL de TBA. Durante o aquecimento da amostra, é possível observar a formação da cor rosa no tubo de ensaio, indicando que há a

presença do aldeído malônico. Quanto mais intensa for a coloração rósea, maior será a concentração do aldeído malônico presente na amostra.

Para a linha de pesquisa em conjunto com o exército brasileiro, foram realizadas nove análises de TBARS e todas apresentaram resultados abaixo de 1,4 mg de aldeído malônico e, portanto, não representaram risco de intoxicação através do consumo.

A **figura 4** mostra a etapa do aquecimento da amostra com a formação da coloração rósea devido à ocorrência de rancidez oxidativa.



Figura 4 – Formação da cor rósea no aquecimento das amostras

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

2.3 ANÁLISE DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS (BVT) PELO MÉTODO DE MICRODIFUSÃO EM PLACA DE CONWAY

As bases voláteis totais são compostos nitrogenados, como a amônia e a trimetilamina, que são formados quando o peixe está em fase de deterioração. Diversos países utilizam a quantidade de bases voláteis presentes no pescado como critério de frescor, entre eles o Brasil, Alemanha, Argentina e Austrália (SCHERER, 2004).

O pescado, após ser capturado, não passa por um processo de abate. Os peixes morrem com a parada da oxigenação e da respiração celular. Com isso ocorre o esgotamento do ATP e o início do acúmulo de amônia, inosina e hipoxantina, que levará ao *rigor mortis* devido à irreversão do complexo actino miosina. Durante o *rigor mortis* ocorre a liberação e ativação das catepsinas que iniciarão o processo de proteólise do colágeno e dos filamentos musculares com produção de aminoácidos livres, que servirão de substrato para o crescimento de microrganismos. Em seguida as bactérias irão produzir os metabólitos que afetam o sabor e o odor da carne como aminas, a amônia e o ácido sulfídrico. Um agravante para a deterioração do pescado de água salgada é a presença do óxido de trimetilamina na musculatura dos peixes que serve como substrato para a produção de trimetilamina por microrganismos (MÁRSICO E MANO, 2008).

Visto que o pescado de água salgada passa por um processo mais rápido de degradação, uma das maneiras de saber se a deterioração está em níveis aceitáveis é por meio da análise de BVT, que, de acordo com a portaria Nº 185 do Ministério da Agricultura, deve apresentar um resultado inferior a 30 mg de Nitrogênio/100g de carne (BRASIL, 1997). A análise consiste na separação de 10 gramas da musculatura epaxial do pescado, que será misturada em um becker com 10 mL de ácido tricloroacético a 10% que em contato com o tecido, ajuda a extrair as bases voláteis da amostra. Em seguida, a mistura é triturada no liquidificador e filtrada na bomba de vácuo com o auxílio do filtro de Whatman em um funil de Büchner acoplado em um kitasato, que fica conectado à da bomba conforme a **figura 5**.



Figura 5 – Filtração da amostra com auxílio da bomba de vácuo

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

A placa de microdifusão de Conway possui dois compartimentos, um externo e um interno, estruturada de maneira que o compartimento interno fique com um nível mais baixo que o externo. Após o preparo da amostra, deve-se transferir 2 mL do ácido bórico de Conway para o compartimento interno da placa de Conway e, em seguida, transferir 2 mL da amostra para o compartimento externo da placa com o auxílio de uma pipeta volumétrica, para então, o vedamento parcial da placa com uma lâmina de vidro e vaselina sólida.

O ácido bórico de Conway é uma solução preparada com ácido bórico e indicador de Tashiro, dessa maneira, se a solução estiver com o pH ácido, a coloração será azul. Se a solução ficar alcalina, a cor mudará para verde. A última etapa do preparo da placa é a adição de 2 mL de carbonato de potássio no compartimento externo da placa de Conway e o vedamento completo dela.

A placa de microdifusão de Conway deve ser levada para uma estufa ajustada para 37°C, onde ficará por duas horas. Durante esse tempo, o carbonato de potássio acelera a volatilização das bases presentes na amostra, que migrarão para o compartimento interno cuja parede circular fica em um nível mais baixo. Ao entrar em contato com o ácido bórico de Conway, no compartimento interno, as bases voláteis tornam a solução alcalina e a coloração muda para verde. Passadas as duas horas, a etapa final da análise é a titulação da solução presente no compartimento interno da placa de microdifusão. A titulação é feita com o ácido clorídrico a 0,01 N até a cor verde passar ao azul original (**figura 6**). Dessa maneira, a quantidade utilizada de ácido clorídrico na titulação será usada na fórmula abaixo para a determinação quantitativa das bases voláteis totais.

$$\text{mg de Nitrogênio/100g} = \frac{V \times N \times 14 \times 100 (T+U)}{V_a \times P}$$

Onde,

V = Volume de HCl gasto na titulação

N = Normalidade da solução de HCl (0,01)

14 = Equivalente grama do Nitrogênio

T = Volume da solução de ácido tricloroacético (10 mL)

U = Umidade da amostra em gramas

V_a = Volume da alíquota analisada (2 mL)

P = Peso da amostra utilizada no preparo do extrato (10 g)

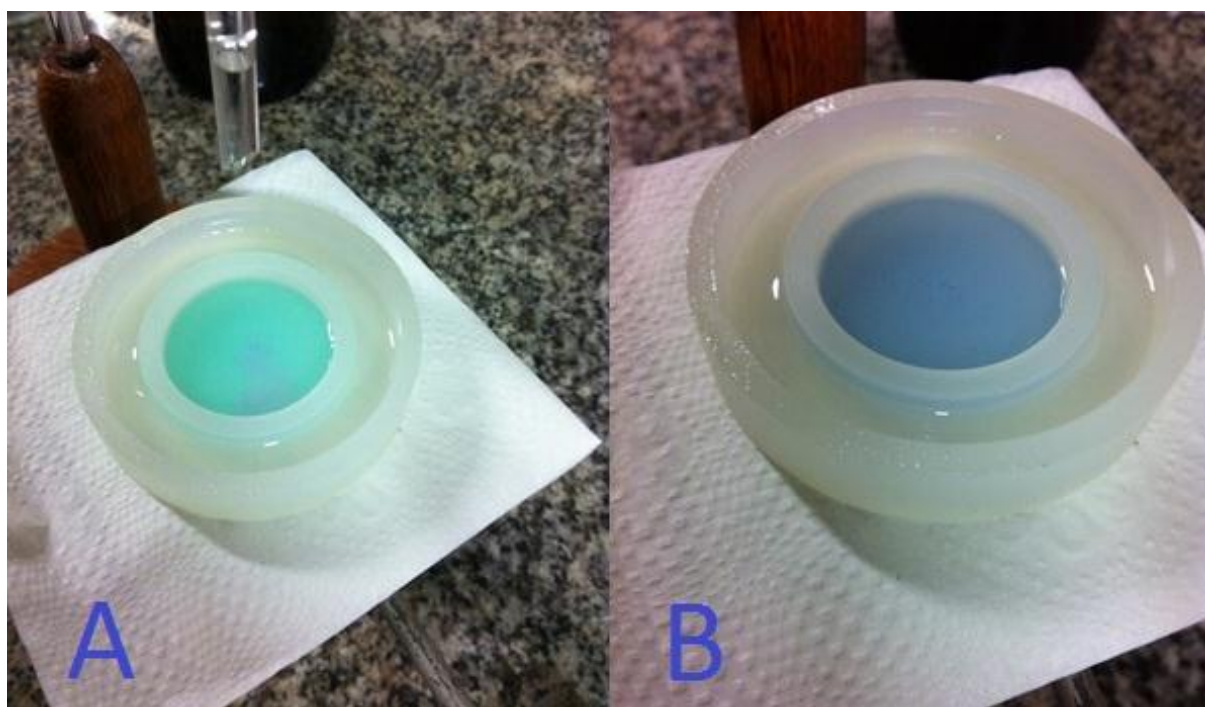


Figura 6 – Placa de Conway durante (A) e depois da titulação (B)

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

As amostras usadas para as análises foram encaminhadas por indústrias que não possuem laboratórios para a realização dos testes do controle de qualidade. Foram feitas 13 análises de BVT durante o período de realização do estágio. As espécies analisadas foram sardinha (*Sardinella brasiliensis*), merluza (*Merluccius hubbsi*) e bonito (*Sarda sarda*).

2.4 PROVA DE NESSLER PARA AMÔNIA (NH₃)

A prova de Nessler para amônia é uma análise qualitativa e colorimétrica realizada para verificação do estado de conservação de carnes. A decomposição das proteínas presentes nas carnes libera o NH₃ e, se essa amônia for detectada na prova de Nessler, significa que a carne está imprópria para o consumo. A mesma indústria que solicitou a prova de Éber para gás sulfídrico pediu, também, essa análise para o peixe bonito. A metodologia é feita com a pesagem de 10 gramas da amostra, que será organizada em uma cápsula de porcelana, de forma que fique um espaço entre a amostra para a

adição de 2 mL do reagente de Nessler no centro da cápsula de porcelana, em contato com a amostra (MÁRSICO e MANO, 2008).

Segundo Mársico e Mano (2008), o reagente de Nessler é uma solução alcalina de tetraiodomercurato de potássio que, ao reagir com o radical amônio, forma um complexo de coloração amarelo alaranjado, e indica que a amostra é positiva para a presença de amônia. Porém, o aparecimento da coloração laranja deve ocorrer no instante da adição do reagente de Nessler para a caracterização da amostra como positiva. No caso da análise realizada, a amostra foi negativa (**figura 7**), mesmo com o aparecimento posterior da coloração laranja, pois, com o passar do tempo, o radical amônio é produzido devido à degradação do pescado em temperatura ambiente.



Figura 7 – Resultado negativo para análise qualitativa de amônia

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

2.5 PROVA DE ÉBER PARA GÁS SULFÍDRICO (H₂S)

Segundo Brasil (2008a), o estudo da conservação de certos produtos protéicos poderá ser avaliado, também, por meio da reação de Éber para gás sulfídrico, onde se constata a presença de H₂S, resultante da decomposição de

aminoácidos sulfurados, que, normalmente são liberados nos estágios de decomposição mais avançados. A ação das bactérias na decomposição libera o enxofre dos aminoácidos sulfurados, que será utilizado para a produção do gás sulfídrico.

Apenas uma indústria fez a solicitação da prova para H_2S e a carne foi de pescado, da espécie *Sarda sarda*, popularmente conhecida como bonito. A análise é simples, e consiste na pesagem de 10 gramas da amostra em um erlenmeyer e a adição de aproximadamente 25 mL de água destilada. O erlenmeyer deve ser fechado com uma tampa de rolha esmerilhada e uma fita contendo acetato de chumbo presa na tampa e voltada para dentro do recipiente, que deverá ser aquecido por 10 minutos em banho-maria ou placa aquecedora como na **figura 8**. Devido à volatilidade, o aquecimento irá liberar o gás sulfídrico da amostra, caso presente. Em seguida, o H_2S reage com o acetato de chumbo presente na fita e forma o sulfeto de chumbo, caracterizado pela coloração preta, o que qualifica a amostra como positiva. No caso da análise realizada, a amostra foi negativa para H_2S apesar de um leve escurecimento da fita, também observado na **figura 8**. É importante saber que a reação de Éber não se aplica no caso de alimentos muito condimentados, temperados com alho, cebola e de conservas de carne e pescado, que foram processadas em alta temperatura e baixa pressão (MÁRSICO E MANO, 2008).

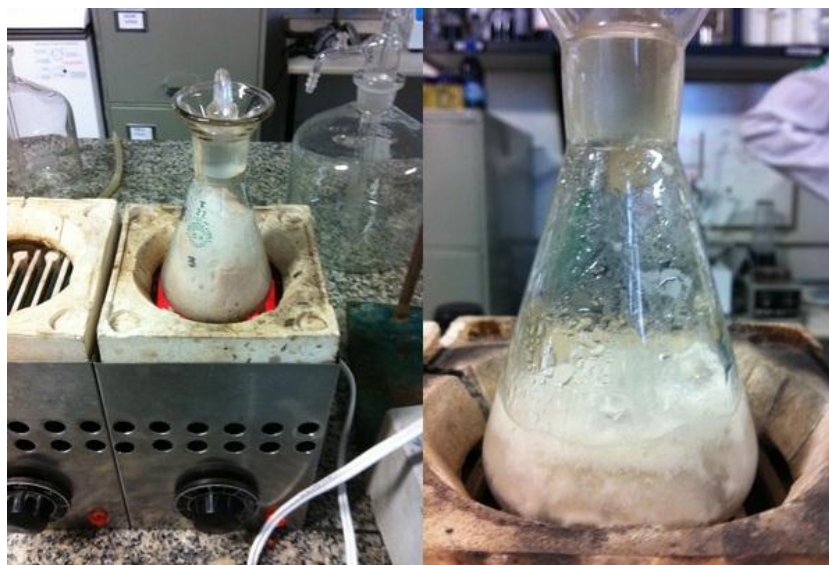


Figura 8 – Elevação da temperatura da amostra em aquecedor

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

2.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

A determinação do pH pode fornecer um dado valioso à avaliação do estado de conservação de um produto alimentício. Um processo de decomposição seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, quase sempre altera a concentração dos íons de hidrogênio. Os processos que avaliam o pH são colorimétricos ou eletrométricos. Os colorimétricos utilizam indicadores que produzem ou alteram a coloração em determinadas concentrações dos íons de hidrogênio. São processos de aplicação limitada, uma vez que as medidas são aproximadas e não se aplicam às soluções intensamente coloridas ou turvas, além das soluções coloidais que podem absorver o indicador, interferindo no resultado. O processo utilizado no laboratório de controle físico químico de alimentos é o eletrométrico, com o uso de aparelhos chamados de pHmetros, que são potenciômetros especialmente adaptados, permitindo a determinação direta, precisa e simples do pH. É importante saber que um pHmetro é um aparelho sensível e necessita de calibrações frequentes. Assim, é necessário ter em posse, junto ao aparelho, soluções tampão com valores de pH conhecidos para o ajuste do aparelho, de acordo com as instruções do fabricante (BRASIL, 2008a).

Segundo Brasil (1981), o pH ideal para carne bovina deve estar entre 5,8 e 6,2 não podendo ultrapassar 6,4 pois acima disso a carne encontra-se em decomposição. Em relação aos peixes, o RIISPOA define que o pH deve ser inferior a 6,5 (BRASIL, 2008b). Porém nem sempre que o valor do pH estiver dentro dos valores ideais para consumo, o produto estará em condições próprias para alimentação. Existem situações específicas como carnes inadequadas para consumo que apresentam bons valores de pH devido à presença em excesso de bactérias produtoras de ácido lático. Por esse motivo, a análise do potencial hidrogeniônico nunca deve ser a única utilizada para a determinação qualitativa de um alimento.

Ao total, foram realizadas 90 análises de pH, sendo que 55 delas foram feitas para indústrias e, 35 foram destinadas a um experimento de mestrado que buscava caracterizar a qualidade da carne de frango desfiada mantida em atmosfera modificada. A determinação do pH foi realizada com o pHmetro do laboratório e, no caso das amostras vindas da indústria, era necessária a homogeneização dos conteúdos de atum enlatado com água destilada para o

posterior contato com o eletrodo do aparelho e a obtenção do resultado. As amostras do experimento já chegavam homogêneas em sacos “stomacher”, que são utilizados para preparo de amostras para análises microbiológicas, tornando a determinação do pH observada na **figura 9** ainda mais rápida.

Visto que o pHmetro é um aparelho sensível, dentre os cuidados que se deve ter é o de rinsar o eletrodo com água destilada após a avaliação de cada amostra e, por fim, ao término de todas as análises, deve-se guardar o eletrodo num recipiente com solução tampão, de maneira que fique completamente submerso para evitar o ressecamento. No caso do aparelho utilizado, o agente tamponante é o carbonato de potássio.



Figura 9 – Determinação do pH em amostras homogêneas no saco “stomacher”

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

2.7 DOSAGEM DE HISTAMINA PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA POR CAMADA DELGADA (CCD)

Aminas biogênicas são bases orgânicas que possuem baixa massa molar e são sintetizadas durante o processo metabólico na maioria dos organismos vivos. São formadas por meio da descarboxilação de aminoácidos, decomposição térmica, hidrólise de compostos nitrogenados ou pela transaminação de aldeídos ou cetonas. É importante determinar o perfil e o teor de aminas biogênicas nos alimentos devido à capacidade de iniciarem

processos toxicológicos e fermentativos. A histamina é uma das aminas biogênicas, e seus efeitos tóxicos envolvem: efeitos nocivos cutâneos, gastrintestinais, hemodinâmicos e neurológicos. Outras aminas como a putrescina, espermina e a espermidina podem acelerar o desenvolvimento de tumores, sendo necessária uma menor ingestão desses compostos por pacientes em tratamento de câncer. A forma de intoxicação mais frequente causada pela histamina é conhecida como “scombroid fish poisoning” que está associada ao consumo de peixes como o atum e a sardinha e se assemelha a uma reação alérgica, que ocorre poucas horas após a ingestão do alimento com níveis elevados dessa amina e tem como sinais a cefaleia, pirose na região bucal, vermelhidão facial, náusea e vômito (AVELAR, 2005).

O principal evento produtor de histamina em pescado é a descarboxilação do aminoácido histidina durante o processo de deterioração. Visto que a degradação do pescado marinho é mais rápida, é necessária maior atenção quanto a quantidade de histamina na musculatura dos peixes e, para essa amina, o Ministério da Agricultura determina que tal quantidade não deve chegar a 10 mg/100 g de amostra (BRASIL, 1997).

Uma das formas de dosagem de histamina é a cromatografia por camada delgada (CCD), que consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado no fenômeno da adsorção. Porém, utilizando-se fases estacionárias tratadas, pode ocorrer, também, por partição ou troca iônica, o que permite o emprego do método tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas.

Um dos adsorventes mais utilizados é a sílica, que, em geral, é empregada na separação de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcalóides, terpenóides e esteróides, usando o mecanismo de adsorção. Outros adsorventes que podem ser utilizados são a alumina, a celulose, e poliamida. A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas, quando se pretende a separação rápida e a identificação visual. É por esse motivo que esse método de separação é utilizado em diversos laboratórios de química ou biologia (COLLINS, 2004).

A realização das análises de histamina no laboratório de controle físico químico da Universidade Federal Fluminense ocorre, na maioria das vezes por demanda de indústrias para o controle de qualidade, e as amostras variam de pescados frescos, congelados e enlatados de diversos tipos.

Para o procedimento da análise são pesados 1 grama da amostra em tubo de centrífuga coletada de diversas partes da musculatura do pescado ou diferentes regiões do conteúdo enlatado para uma representação fiel da amostra como um todo. Após a pesagem, segue a adição de 2 mL de metanol no tubo para o processo de extração das aminas biogênicas, que será acelerado pelo processo de homegeneização por agitador Vortex. As amostras ainda no tubo de centrífuga são colocadas em Becker com água em um aquecedor (**figura 10**) até a observação de bolhas no tubo e a formação de rachaduras na amostra sólida indicando que houve desnaturação das proteínas e a separação das aminas biogênicas que irão se misturar ao álcool metílico.



Figura 10 – Homogeneização (A) e aquecimento (B) das amostras

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

Em seguida, os tubos são levados à centrífuga ajustada para 3000 rpm, durante dois minutos, para a sedimentação dos resíduos sólidos e o término do preparo da amostra.

A análise será realizada em uma placa de sílica gel, que será cortada em tamanho proporcional à quantidade de amostras, com identificações feitas a lápis na parte inferior para a aplicação das alíquotas, bem como a injeção do padrão de histamina. Com o auxílio de uma microseringa, o padrão de histamina será aplicado nos pontos de identificação na placa que indicam as quantidades de 2 μL (mg/100g), 5 μL e 10 μL . Nos pontos de identificação das amostras, deverão ser aplicadas com uma pipeta automática ajustada para a quantidade de 10 μL . Todas as aplicações, incluindo as do padrão, deverão ser feitas lentamente, com o auxílio de um secador para que o líquido não se espalhe muito pela placa.

Com o término do preparo da placa, esta deverá ser colocada em uma cuba de cromatografia contendo 20 mL de acetona e 1 mL de hidróxido de amônio, que serão a fase móvel utilizada na análise. A cuba deverá ser vedada com uma tampa e vaselina sólida.

A **figura 11** mostra o esquema de uma cuba com a placa em uma visão lateral e, à direita, a foto de uma cuba na vista frontal.

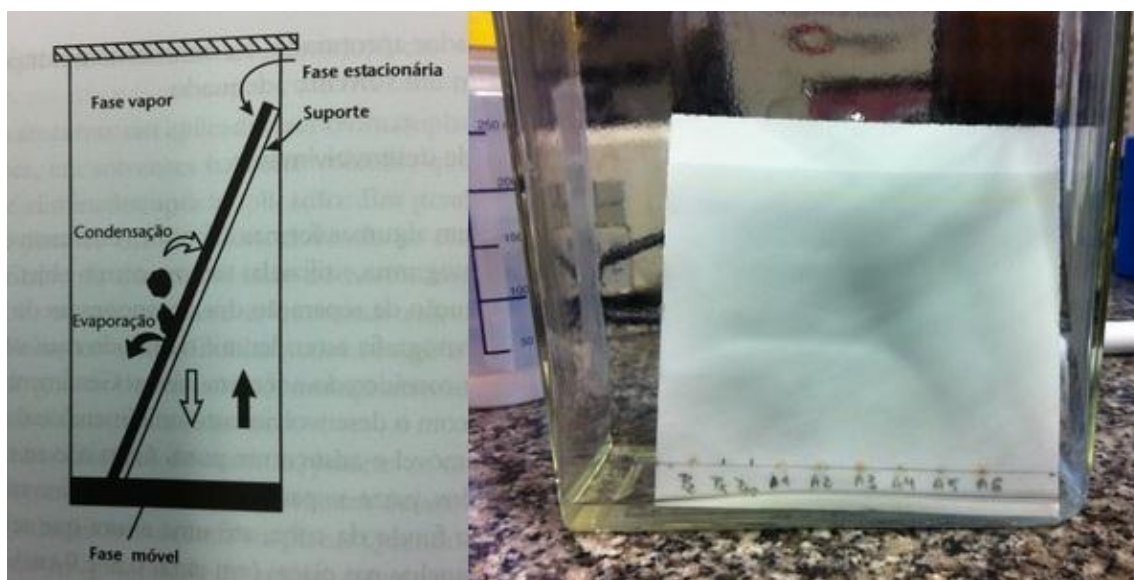


Figura 11 – Cubas de cromatografia

Fontes: COLLINS, 2004 e Arquivo pessoal / José Fonseca

O eluente é a fase móvel constituída pela acetona e o hidróxido de amônio, que servirá como carreador das amins biogênicas aplicadas na placa e, dessa maneira, cada amina se comporta de maneira diferente, sendo levada

para uma altura diferente na placa. A presença dos padrões torna possível a identificação da histamina presente na amostra, além de uma limitada quantificação. A placa deverá ser retirada da cuba antes que o eluente a preencha completamente e, então, ser secada até a evaporação total da fase móvel, pois as amins presentes na placa são invisíveis a olho nu e deverão ser reveladas com um composto que reage com a amônia. Por isso, se a fase móvel ainda estiver presente na hora da revelação, a análise estará comprometida pelo aparecimento de manchas indesejáveis. A revelação é feita por aspersão com o composto chamado ninhidrina, que reage com as amins formando uma coloração roxa ou rósea, cuja intensidade depende da quantidade de amins presentes na placa, conforme a **figura 12**.



Figura 12 – Revelação da placa de sílica com ninhidrina

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

Ainda com base na **figura 12**, a histamina é carregada pela fase móvel até certa altura e os padrões apresentam a intensidade da coloração de acordo com a quantidade aplicada. No caso das amostras, se não aparecerem manchas róseas na mesma altura das manchas dos padrões, significa que as amostras são negativas para histamina.

Foram solicitadas 174 análises para histamina durante o período de realização do estágio e, apenas duas, apresentaram resultados positivos para a presença da amina, porém com quantidades aceitas pela legislação, pois apresentaram valores abaixo de 5 mg/100g.

2.8 EXTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Segundo Collins (2004), a CLAE faz parte de um conjunto de métodos destinados a separar misturas que contenham grande número de compostos similares. Vários nomes são utilizados para denominar a cromatografia líquida: alta precisão, alta velocidade, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência, sendo que o nome mais utilizado no Brasil é cromatografia líquida de alta eficiência, que vem do inglês “high performance liquid chromatography” (HPLC).

A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados e emprega colunas preenchidas com materiais especialmente preparados a uma fase móvel, eluída sob elevadas pressões. É uma análise qualitativa e quantitativa, capaz de realizar separações de uma grande variedade de compostos contidos em diversos tipos de amostras em poucos minutos, com alta resolução e eficiência.

A fase móvel possui um papel muito importante nas variedades de cromatografia, porém, na CLAE, ela exerce duas funções: arrasta os componentes da amostra pelo sistema cromatográfico, além de participar do processo de separação. Dessa maneira, a seleção de uma fase móvel que será utilizada é feita com base em uma fórmula complexa, que envolve diversos parâmetros cromatográficos. Dentre os critérios a serem considerados para a seleção de uma fase móvel estão: elevado grau de pureza, baixa viscosidade, baixo ponto de ebulição, compatibilidade com o detector e miscibilidade completa. Tais características são importantes, pois, impurezas na fase móvel podem ser detectadas e poderão ser confundidas com a amostra. A viscosidade interfere e dificulta a transferência de massas entre a amostra e a fase móvel, sendo necessária uma pressão maior, resultando no desgaste da coluna ou possíveis vazamentos. O ponto de fusão deve ser pequeno, pois, quanto menor for, menor será a viscosidade. Porém, deve estar 20 °C a 50 °C acima da temperatura de separação, para evitar a mudança de fase e a formação de bolhas na coluna ou no detector (COLLINS, 2004).

Para a análise de aminas biogênicas pelo método de CLAE, o eluente escolhido foi a acetonitrila, que é o solvente orgânico mais utilizado em cromatografia líquida de alta eficiência, graças as suas características únicas:

baixa viscosidade, baixa absorção de luz ultravioleta e alta miscibilidade (PACHECO, 2011).

O primeiro cromatógrafo utilizado para as análises é o presente na **figura 13**, que possui o sistema de injeção manual das amostras, bomba de alta pressão, detector ultravioleta, coluna, reservatório da fase móvel e o cromatopac, que é o aparelho com sistema de aquisição de dados que transfere os resultados da análise para o papel, podendo ser substituído por computadores e monitores para melhor visualização e manejo das informações. Todos os compartimentos do cromatógrafo devem ser conectados por tubos e conexões, evitando ao máximo o extravasamento do líquido que corre pelo sistema.



Figura 13 – Constituintes do cromatógrafo

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

Como complemento à **figura 13**, a **figura 14** ilustra o esquema de um cromatógrafo líquido e seus compartimentos, em que as linhas tracejadas indicam unidades possíveis de controle de temperatura, que ocorre no detector do aparelho na **figura 13**.

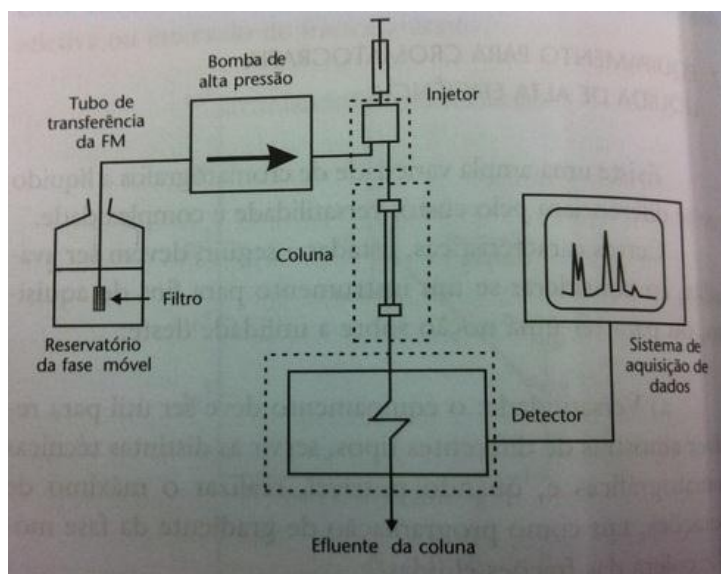


Figura 14 – Esquema de um cromatógrafo líquido

Fonte: COLLINS, 2004

Visto que a CLAE realiza uma análise mais precisa que a CCD, a extração das aminos biogênicas requer um processamento com mais etapas e mais complexo da amostra, para evitar ao máximo a presença de impurezas que poderão ser detectadas no cromatógrafo.

A primeira etapa da extração é a pesagem de 5 gramas de amostra em tubos cônicos de centrífuga e a adição de 5 mL de ácido perclórico, que vai realizar a mesma função do metanol na CCD (separar as aminos do restante da amostra). Em seguida, o conteúdo do tubo deve ser homogeneizado em Vortex por 2 minutos e, então, resfriado em geladeira por uma hora. Durante o intervalo de uma hora, os tubos deverão ser homogeneizados, novamente, a cada 10 minutos e, após o intervalo, serão levados para a centrifugação a 3000 rpm na temperatura de 4 °C durante 10 minutos para catalisar o processo de separação e sedimentar a amostra sólida.

A etapa seguinte é a filtração do conteúdo líquido nos tubos de centrífuga, com o auxílio de filtro Whatman e funil (**figura 15**), para a então adição de 1 mL de hidróxido de sódio. A amostra deve ser homogeneizada novamente por 30 segundos e seguir para um banho de gelo durante meia hora. Após o resfriamento em gelo, mais uma filtração deve ser feita, além da adição de mais 1 mL de NaOH. O pH da amostra deve ser medido e estar acima de 12, pois, a próxima etapa requer a ação de um composto chamado

benzoyl (cloreto de benzoíla), que se liga às amins e isso só é possível em meios altamente alcalinos.



Figura 15 – Filtração da amostra com papel filtro de Whatman

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

Com o pH elevado, começa a etapa de derivatização ou isolamento das amins em que deverá ser feita, com o auxílio de uma pipeta automática, a adição de 40 μ L de cloreto de benzoíla, que tem a função de se ligar às amins presentes na amostra. Em seguida mais uma homogeneização de 30 segundos deve ser feita e então a amostra deverá ficar em repouso durante 20 minutos para a ação do benzoyl, que só é efetiva em soluções muito alcalinas, explicando o hidróxido de sódio acrescido à alíquota.

Após o repouso em temperatura ambiente, 1 mL de éter dietílico deve ser aplicado na amostra para se ligar no composto formado pelo benzoyl e as amins biogênicas, formando um sobrenadante etéreo, que deverá ser separado da amostra com uma pipeta automática e colocado em um tubo de ensaio. Feito isso, a última etapa da extração é a remoção do éter dietílico e do cloreto de benzoíla com o auxílio de um evaporador de nitrogênio. Dessa maneira, restarão apenas as amins biogênicas no tubo, que serão homogeneizadas com a fase móvel para a injeção da amostra no cromatógrafo.

Após a extração das aminas resta apenas a análise por cromatografia em que a injeção da amostra (**figura 16**) deve ser precedida pela passagem de um padrão de aminas (MIX) no sistema para a comparação dos resultados.



Figura 16 – Aplicação da amostra no injetor manual

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

O resultado aparece no sistema de aquisição de dados, em forma de um gráfico, em que os picos representam a quantidade de determinada amina, e o tempo próximo aos picos identifica a amina biogênica, pois, cada amina tem um período próprio em que fica retida na coluna do cromatógrafo. Esse tempo é determinado pela afinidade de cada amina com os componentes específicos presentes na coluna e identificado pelo detector ultravioleta do aparelho. É possível, também, a determinação da concentração de cada amina biogênica presente na amostra. Para isso é necessária a aplicação do padrão MIX, que contendo as aminas que se deseja identificar. Cromatógrafos mais modernos calculam a concentração de cada amina com base na área do gráfico formado pelos picos de cada uma delas.

A **figura 17** ilustra o gráfico fornecido pelo cromatógrafo após a injeção de um padrão MIX contendo as seguintes aminas biogênicas: Tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, histamina e espermina.

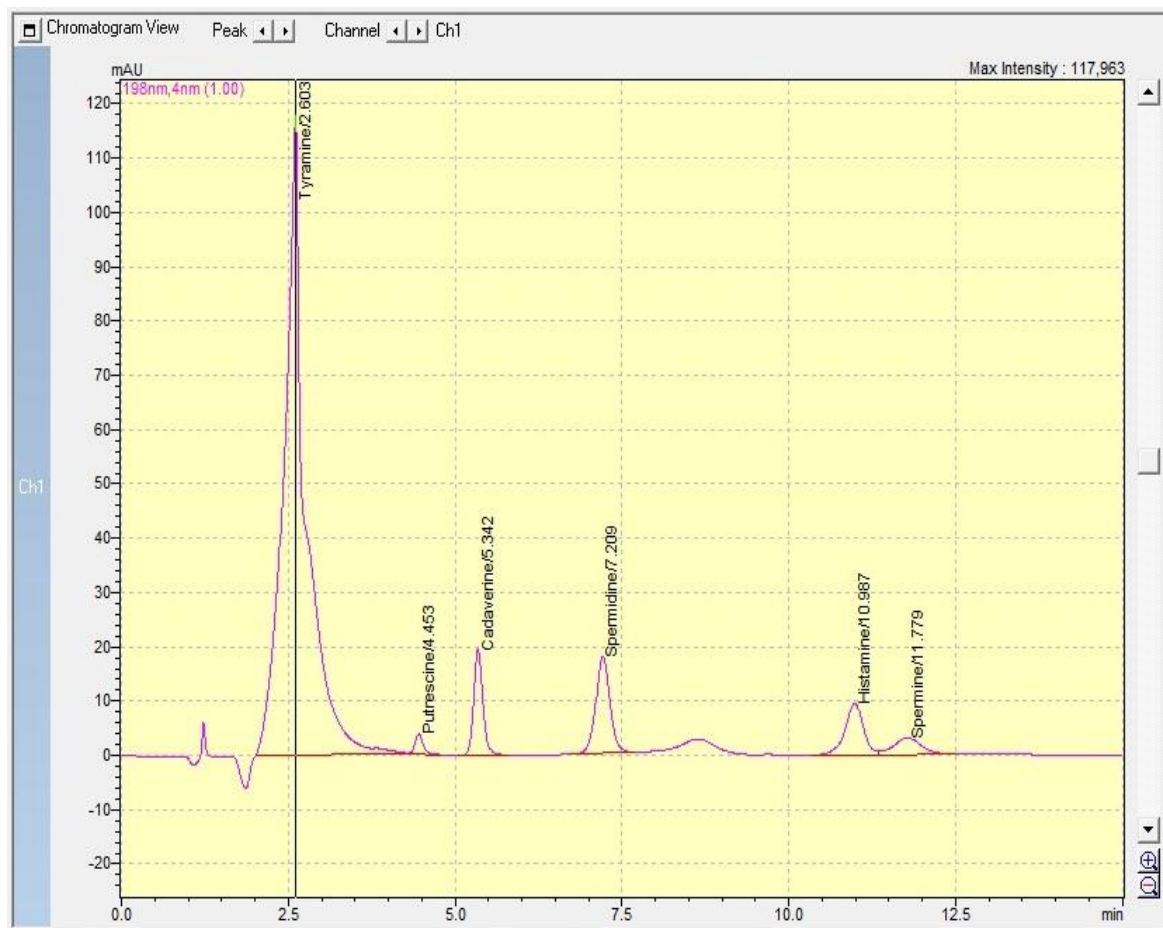


Figura 17 – Resultado gráfico do padrão MIX inserido no cromatógrafo

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

3 CASUÍSTICA E RESULTADOS

A quase totalidade das análises foi feita em pescado, com exceção das de peróxidos e cloretos, realizadas para óleo vegetal e as análises de granulometria, realizadas parcialmente com sedimentos de uma lagoa.

A casuística está dividida em dois gráficos, representando a quantidade de amostras por análise. O **gráfico 1** ilustra a quantidade de amostras processadas e analisadas, a fim de obter resultados para as linhas de pesquisa realizadas no laboratório.

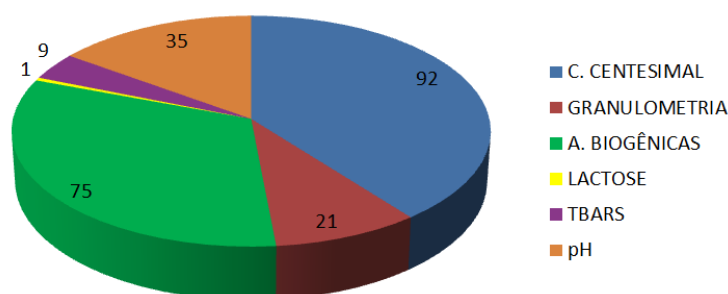


Gráfico 1 – Análises de pesquisa

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

O **gráfico 2** ilustra as análises de rotina com suas respectivas amostras, sendo que foram obtidos resultados positivos apenas para duas análises de histamina, com valores permitidos pela legislação e menores do que 5 mg/100g de amostra.

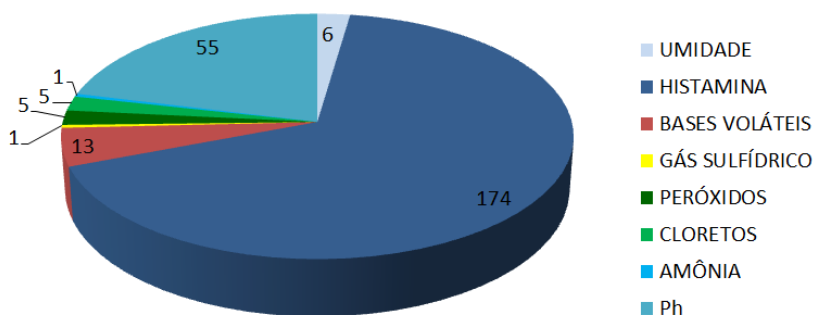


Gráfico 2 – Análises de rotina

Fonte: Arquivo pessoal / José Fonseca

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de realização do estágio, as análises de rotina realizadas no laboratório apresentaram resultados satisfatórios. Dentre os compostos identificados e quantificados, nenhum se apresentou em condições de risco à saúde pública. As análises de histamina e bases voláteis totais, mesmo com resultados positivos para a presença de compostos prejudiciais à saúde, obtiveram resultados e concentrações abaixo dos limites determinados pela legislação.

Os resultados obtidos permitem a inferência de que as indústrias não tiveram problemas em relação à presença e quantidade elevada de compostos prejudiciais nas carnes de pescado relativamente às análises feitas no laboratório de controle físico-químico. Supondo que, também, não houve barreiras nas análises microbiológicas, as indústrias locais estão de acordo com a legislação atual e o controle de qualidade está sendo efetivado.

É importante apontar que o controle de qualidade deve ser feito com rigor, mesmo que os resultados se apresentem satisfatórios durante determinado período, nunca comprometendo a eficácia e a sensibilidade das metodologias analíticas realizadas, pois pode haver contaminações em várias etapas do processamento de produtos de origem animal. Os erros também podem ocorrer durante as análises, podendo comprometer a credibilidade do laboratório em caso de reincidências.

O período de estágio supervisionado na Universidade Federal Fluminense foi de considerável importância, possibilitando um aprendizado prático na área de alimentos. As análises de rotina, e seus resultados, ajudaram no aprofundamento dos conhecimentos na área de atuação, e as linhas de pesquisa fizeram um papel semelhante no sentido de aguçar ainda mais o interesse pela área, devido aos temas abordados e à presença pessoas dedicadas e comprometidas com os resultados de suas pesquisas, disseminando as melhores práticas e recomendando o máximo de responsabilidade na busca dos métodos mais adequados às análises sob sua condução.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Júlio M. A. **Química de Alimentos Teórica e Prática**. Quinta Edição. Editora UFV. Viçosa, 2011.

AVELAR, Érica C.; Adriana S. França; Vany P. Ferraz. **Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas, 2005. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT01.pdf>> Acesso em: 04 jun 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: II – Métodos físico e químicos**. Aprovado pela portaria n. 001 de 07/10/81. Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 185 de 13 de maio de 1997. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado); considerando a necessidade de padronizar os processos de elaboração dos produtos de origem animal**. Brasília, 1997.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed, 1. ed digital. São Paulo, 2008a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília, 2008b.

CONEGLIAN, Sabrina Marcatonio; Beatriz da Silva Lima; Lorryny Galoro da Silva; Claudia Mara Lazzari; Román David Castañeda Serrano; Cleiton Luiz Tonello. **Utilização de antioxidantes nas rações**. PUBVET. Londrina, 2011.

Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/imagens/artigos/432011-181359-lima1026.pdf>> Acesso em: 04 jul 2012

COLLINS, Carol H. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, 2004.

FERREIRA, Fernanda Nunes; Maria Inês Couto Monteiro; Lílian Irene Dias da Silva. **Determinação de Nitrogênio Total em Amostras de Rocha Petrolífera pelo Método Kjeldahl / Indofenol**. I Jornada do Programa de Capacitação Interna – CETEM, 2007. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_I_jpci_2007/Fernanda_Nunes_Ferreira.pdf> Acesso em: 26 jun 2012

GIUNTINI, Eliana B.; Franco M. Lajolo; Elizabete Wenzel de Menezes. **Composição de alimentos: um pouco de história**. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.alanrevista.org/ediciones/2006-3/composicao_alimentos_historia.asp#> Acesso em: 12 jun 2012

JULIÃO, Alessandra Matos. **Avaliação da composição centesimal e aceitação sensorial da carne de frangos de linhagens comercial e tipo colonial comercializadas em nível varejista**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2003. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/alessandra_juliao_completa_mestrado.pdf> Acesso em: 04 jul 2012

MÁRSICO, Eliane Teixeira; MANO, Sérgio Borges. **Tópicos em controle físico-químico de produtos de origem animal**. Apostila. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Manual de Segurança Biológica em Laboratório**. 3. ed. Genebra, 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebp.ort.pdf>> Acesso em: 16 mai 2012.

PACHECO, Sidney; Godoy, R.L.O; Oiano-Neto, J.; Araujo, M.C.P.; Rosa, J.S.; Monte, P.H.F. **Recuperação e reutilização de acetonitrila utilizada em análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência**. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Resumo em anais de congresso (ALICE). Rio de Janeiro, 2011. Disponível em:

<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/880870>> Acesso em: 12 jun 2012

SCHERER, Rodrigo; Ana P. Daniel; Paula R. Augusti; Rafael Lazzari; Ronaldo L. de Lima; Leadir L. M. Fries; João Radunz Neto; Tatiana Emanuelli. **Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos (online). Vol.24, n.4, pp. 680-684. Campinas, 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400034> Acesso em: 02 jun 2012.

TERRA, Nelcindo Nascimento; Alexandre José Cichoski; Renato João Sossela de Freitas. **Valores de nitrito e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada**. Universidade Federal de Santa Maria. Ciência Rural, maio-junho, vol.36. Santa Maria, 2006. Disponível em:

<<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33136337.pdf>> Acesso em: 01 jul 2012